

• 药理与临床 •

石榴皮鞣质对肾小球硬化大鼠内源性物质代谢的影响及代谢通路分析

周本宏^{1,2}, 陈 鹏¹, 涂 杰³, 吴 玥¹, 刘 刚¹

1. 武汉大学人民医院, 湖北 武汉 430060

2. 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430071

3. 武汉市中心医院, 湖北 武汉 430014

摘 要: 目的 利用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS)的尿液代谢组学研究方法,考察石榴皮鞣质对肾小球硬化大鼠内源性物质代谢的影响,寻找潜在的生物标志物并分析其代谢途径,为研究石榴皮鞣质对肾小球硬化大鼠的改善作用及其机制提供理论依据。方法 将 48 只 SD 大鼠随机分为假手术组,模型组,贝那普利组,石榴皮鞣质高、中、低剂量组,采用单侧肾切除结合 2 次尾 iv 盐酸多柔比星的方法制备肾小球硬化大鼠模型,ig 给药 8 周,每周收集大鼠 24 h 尿液,用 HPLC-MS 对其检测分析;采用主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)及正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)等方法对每组大鼠尿液代谢物进行聚类分析,筛选出潜在的生物标志物并构建相应的代谢通路。结果 代谢组学分析发现给药后第 8 周各组大鼠尿液有明显的聚类现象,通过对重要变量的分析鉴定,筛选出 10 个潜在的生物标志物;涉及的代谢通路包括色氨酸、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸等多种氨基酸的代谢通路。结论 石榴皮鞣质干预下的肾小球硬化大鼠内源性代谢物聚类性趋近正常水平,为进一步阐明石榴皮鞣质对肾小球硬化大鼠的作用机制提供依据。

关键词: 石榴皮鞣质; 肾小球硬化; 尿液代谢组学; 生物标志物; 色氨酸; 丙氨酸; 天冬氨酸; 谷氨酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)10-2072-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.023

Effects of tannins from *Granati Pericarpium* on endogenous substance metabolism and analysis on metabolic pathway in rats with glomerulosclerosisZHOU Ben-hong^{1,2}, CHEN Peng¹, TU Jie³, WU Yue¹, LIU Gang¹

1. Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China

3. The Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, China

Abstract: Objective A urinary metabolomics method based on liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) was used to inspect the effect of tannins from *Granati Pericarpium* on endogenous metabolism of rats with glomerulosclerosis, the potential biomarkers were searched and the metabolic pathways were analyzed to provide relevant theory for treatment of glomerulosclerosis.

Methods Forty-eight SD rats were divided into control group, model group, benazepril hydrochloride group, and three doses of pomegranate tannins groups. Glomerular sclerosis model was established by unilateral nephrectomy combined with two tail iv adriamycin; 24 h urine of rats was collected after the rats were orally given tannins from *Granati Pericarpium* for 8 weeks; HPLC-MS was used for testing and analyzing the urine; Principal component analysis (PCA), partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used for data treatment of each group to search the potential biomarkers and build the metabolomics pathways. **Results** The urinary metabolism of rats was clustering. Ten potential biomarkers were screened by analysis and identification of important variables; The metabolomics pathways involved tryptophan, alanine, aspartate, glutamate metabolism, etc. **Conclusion** The trend of endogenous metabolism of rats with glomerulosclerosis is normal after intervened by tannins in pomegranate tannins from *Granati Pericarpium*. It provides the basement with the further research of clarifying the mechanism of tannins from *Granati Pericarpium* impacting on rats with glomerulosclerosis.

Key words: tannins from *Punica granatum*; glomerulosclerosis; urinary metabolomics; biomarker; tryptophan; alanine; aspartate; glutamate

收稿日期: 2016-11-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31170330)

作者简介: 周本宏, 男, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为天然药物化学及中药代谢组学研究。Tel: 15335898431 E-mail: benhongzh@163.com

自从肾脏疾病和泌尿道疾病被列入 15 种全球致死率最高的疾病以来,慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)已作为世界范围内威胁公众健康的主要疾病而得到广泛重视。病理学研究表明肾小球硬化是 CKD 发展成慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)的标志,也是 CKD 发展成肾病综合征(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)的普遍结果^[1]。近年来,随着国内外在肾小球硬化疾病领域研究的不断深入,肾小球硬化动物模型成为研究慢性肾小球疾病进程和 CRF 的重要方法之一。

石榴皮为石榴科(Punicaceae)石榴属 *Punica* Linn. 落叶灌木或小乔木石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮,是中国传统的中药材,一直被《中国药典》所收载,传统医学认为石榴皮具有涩肠、止血、杀虫之功效。《中国药典》2015 年版^[2]规定石榴皮中鞣质不得低于 10%,可见鞣质类成分是影响石榴皮质量的主要因素。本课题组在前期的研究中发现,石榴皮鞣质对腺嘌呤慢性肾衰竭大鼠、阿霉素肾病综合征大鼠、慢性肾小球肾炎大鼠、Heymann 肾炎以及单侧输尿管梗阻大鼠症状均有改善作用^[3-5],表明石榴皮鞣质具有改善肾功能的作用,具有进一步深入研究以及开发利用的价值。现代研究表明石榴皮中富含鞣质类化合物,是其发挥药理活性的主要物质基础,其作用机制与其在体内的代谢转运具有紧密联系。

代谢组学是继蛋白组学、基因组学等之后发展起来的一门新技术,目前被广泛运用于研究现代中药对疾病的预防、诊断和治疗等临床实践中,其从机体整体代谢水平反映中药作用机制,与中医药的整体观念一致,在中药药理学研究中具有明显的优势^[6]。本实验在前期研究的基础上,通过尿样代谢组学方法,采用肾单侧切除结合 2 次尾 iv 多柔比星制备肾小球硬化大鼠模型的方法,应用 HPLC-MS 联用技术,分析石榴皮鞣质干预下大鼠尿液内源性代谢物的变化及相关的代谢通路,进一步探讨石榴皮鞣质对肾小球硬化模型大鼠的改善作用的相关机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

石榴皮购于武汉市中药材市场,经武汉大学人民医院药学部张洪教授鉴定为石榴科石榴属植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮,且符合《中国药典》2015 年版标准。HPD 树脂(沧州宝恩化

工有限公司);对照品没食子酸(批号 MUST-14040103,成都曼斯特生物科技有限公司);盐酸贝那普利(批号 H20044840,质量分数≥98%,上海新亚药业闵行有限公司);盐酸多柔比星(浙江海正药业股份有限公司,批号 130705);甲醇、乙腈、醋酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.2 动物

SD 大鼠,体质量 200~220 g,购于武汉大学动物实验中心,动物使用许可证号 SCXK(鄂)2008-0004。

1.3 仪器

1100 型高效液相色谱仪(配备离子阱质谱仪,安捷伦公司);Neofuge 15R 台式高速冷冻离心机[力新仪器(上海)有限公司];HH-2 电热控温水浴锅(深圳天南海北实业有限公司);RE-52C 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);ALPHA1-4/RZ-2 型冷冻干燥机(德国 Martin Christ 公司)。

2 方法

2.1 药材的提取

称取适量干燥的石榴皮,用粉碎机粉碎后,在室温下,用 10 倍量 70%丙酮浸渍 6 h 后,超声提取 30 min,再滤取滤液。其残渣重复以上操作 2 次后,合并滤液并浓缩,回收溶剂,加水稀释至适当浓度,即得石榴皮鞣质粗提物。

2.2 粗提物的纯化

根据本课题组前期研究,正交优化得出的石榴皮鞣质最佳纯化方法^[7]。采用 HPD-400 大孔树脂纯化,其工艺条件为上样液质量浓度 4.35 mg/mL,吸附体积流量为 2 BV/h,上柱量 5 BV,以 70%乙醇洗脱,用量为 2 BV,得到纯化后的石榴皮提取液,冷冻干燥得石榴皮鞣质粉末。

2.3 总鞣质的定量测定^[2]

参照《中国药典》2015 年版中鞣质的测定方法,即磷钼钨酸-干酪素比色法对终产物中石榴皮鞣质的量进行测定,测得质量分数为 60.49%,将最终得到的石榴皮鞣质粉末密闭保存于干燥器中,备用。

2.4 肾小球硬化模型的制备与给药

2.4.1 肾小球硬化模型的制备 根据文献报道的方法^[8]并做相应调整后,采用左侧肾切除再结合大鼠尾 iv 盐酸多柔比星的方法构建大鼠肾小球硬化模型。具体方法:用 10%水合氯醛(按 3 mL/kg)ip 麻醉大鼠,仰卧固定,腹部备皮,碘伏消毒,在无菌条件下,沿腹中线偏左 1 cm 处行纵向切口约 3

cm, 逐层分离皮肤、组织层, 暴露出左侧肾脏, 用 4~0 号手术缝合线在接近肾门处将肾动脉和肾静脉一起结扎, 并远离结扎处 0.5 cm 处再进行二次结扎, 并在此处用止血钳止血, 在 2 次结扎中间处, 用手术剪一并剪断肾静脉和肾动脉, 若无出血渗血情况, 松开止血钳, 游离出肾脏且不损伤肾上腺, 同时结扎左侧尿管。之后用 1 mL 五水头孢唑林钠 (1 g/100 mL 双蒸水) 对手术组进行局部抗感染, 之后依次缝合肌肉层和皮肤层, 关闭腹腔。其中假手术组按以上操作步骤进行手术, 仅游离左侧肾脏, 触及肾包膜, 不切除肾脏, 也不对其进行结扎, 术后连续 3 d, 每日 ip 注射 1 mL 五水头孢唑林钠 (1 g/100 mL 双蒸水), 同时在手术缝合处用碘伏对伤口进行消毒, 防止感染。在切除大鼠左侧肾脏后第 7、14 天, 分别由尾 iv 盐酸多柔比星注射液各 5 mg/kg。

2.4.2 动物分组与给药 将 48 只 SD 大鼠于 SPF 级环境中适应性饲养 1 周, 随机分为 6 组, 即假手术组, 模型组, 贝那普利组, 石榴皮鞣质高、中、低剂量组, 每组 8 只。术后 3 d, 开始 ig 给药, 石榴皮鞣质高、中、低剂量组分别以 60、40、20 mg/kg 的剂量 ig 给予石榴皮鞣质 (双蒸水溶解)。贝那普利组按 10 mg/kg 剂量 ig 给予盐酸贝那普利, 假手术组与模型组均 ig 给予同等体积的生理盐水。各组大鼠每天按同一时间 ig 1 次, 连续给药 8 周, 每周收集各组大鼠 24 h 尿液, 直到实验结束。

2.5 尿蛋白测定方法

各组大鼠在给药后的第 2、4、8 周分别置于代谢笼内留取 24 h 尿液, 记录 24 h 尿量, 磺硫酸-硫酸钠比浊法检测 24 h 尿蛋白的量。

2.6 尿液样品的制备

将代谢笼收集到的尿液于 -70 °C 低温下储存, 检测时, 取尿样于冰上融化, 在 1.5×10^4 r/min, 4 °C

下离心 5 min, 取上清液 0.5 mL 加入甲醇 0.5 mL, 涡旋混匀, 置 4 °C 下静置 3 h, 于 3×10^4 r/min, 离心 10 min, 取上清液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过后用于 HPLC-MS 分析。

2.7 色谱与质谱条件

色谱条件: PHENOMEX QC MIX870 色谱柱 (50 mm $\times$ 4.6 mm, 2.6 μ m), 进样量 1 μ L, 柱温 40 °C, 运行 30 min。流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液, 体积流量为 2 mL/min。洗脱梯度: 0~5 min, 0~20% A; 5~12 min, 20%~50% A; 12~25 min, 50%~80% A; 25~30 min, 80%~100% A。毛细管电压为 4 000 V; 雾化器压力为 275.8 kPa (40 psi); 干燥气体积流量 10 L/min, 干燥气温度 350 °C, 采用全扫描, 质量扫描范围 m/z 100~1 000。

2.8 数据处理及生物标志物筛选

采用 MarkerView 1.2.1 软件对尿液质谱图信息进行峰匹配、峰提取及数据导出等处理。将上述得到的数据导入 SIMCIAP 12.0 软件进行主成分分析 (PCA)。采用无监督模式识别的 PCA 法、有监督模式识别的偏最小二乘法 (PLS-DA) 及正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 进行判别分析。通过得分图 (scores plot) 比较各组样本组间的差异, 筛选出对代谢影响最大的给药组, 寻找造成组间差异的生物标志物。所有数据采用 SPSS 20.0 统计分析软件进行处理, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 One-way ANOVA 法来判别组间的差异性。

3 结果

3.1 大鼠尿蛋白变化情况

大鼠 24 h 尿蛋白检测结果显示 (表 1), 给药 2 周, 模型组大鼠尿蛋白量较假手术组明显增多 ($P < 0.01$); 贝那普利组及石榴皮鞣质低、中、高剂量组

表 1 治疗 2、4、8 周后各组大鼠 24 h 尿蛋白变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Changes of proteinuria in 24h urine of SD rats after 2, 4, and 8 weeks of treatment ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	$\rho/(mg \cdot kg^{-1})$	尿蛋白量/(mg $\cdot$ 24 h $^{-1}$)		
		药后 2 周	药后 4 周	药后 8 周
对照	—	4.78 $\pm$ 1.28	6.34 $\pm$ 0.51	8.45 $\pm$ 0.15
模型	—	221.34 $\pm$ 3.68**	257.60 $\pm$ 1.10**	280.62 $\pm$ 2.89**
贝那普利	10	168.50 $\pm$ 4.90**	173.40 $\pm$ 5.36***	179.60 $\pm$ 3.65***
石榴皮鞣质	20	197.96 $\pm$ 3.85**	198.35 $\pm$ 2.85**	210.30 $\pm$ 7.58**
	40	156.82 $\pm$ 5.94**	168.96 $\pm$ 6.94**	192.68 $\pm$ 6.46**
	60	110.09 $\pm$ 3.89***	123.96 $\pm$ 6.42***	137.70 $\pm$ 3.17***

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Sham group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.01$ vs model group

尿蛋白量较假手术组均有不同程度的上调 ($P < 0.01$); 石榴皮鞣质高剂量组 24 h 尿蛋白量显著低于模型组 ($P < 0.05$), 其他各组尿蛋白的量得到一定的控制, 但差异无统计学意义。给药 4 周后, 模型组, 贝那普利组, 石榴皮鞣质低、中、高剂量组较假手术组尿蛋白量有显著的增多 ($P < 0.01$), 石榴皮鞣质高剂量组较模型组尿蛋白量下调作用明显 ($P < 0.01$)。给药 8 周后, 模型组, 贝那普利组和石榴皮鞣质低、中、高剂量组大鼠尿蛋白量较假手术组均有显著的增加 ($P < 0.01$), 石榴皮鞣质高剂量

组与贝那普利组较模型组尿蛋白量均有显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01), 手术后各组大鼠尿蛋白量呈时间依赖性变化。给予药物干预后, 均有不同程度的缓解与改善。这说明, 石榴皮鞣质对肾小球硬化导致的尿蛋白水平的改善具有积极意义。

3.2 给药大鼠尿液总离子流图

采用 HPLC-MS 技术对 6 组大鼠尿液进行分析, 得到全扫描监测的尿液总离子流图, 反映尿液样品的化合物信息, 从中提取质谱信息、 m/z 值及相应的丰度, 见图 1。

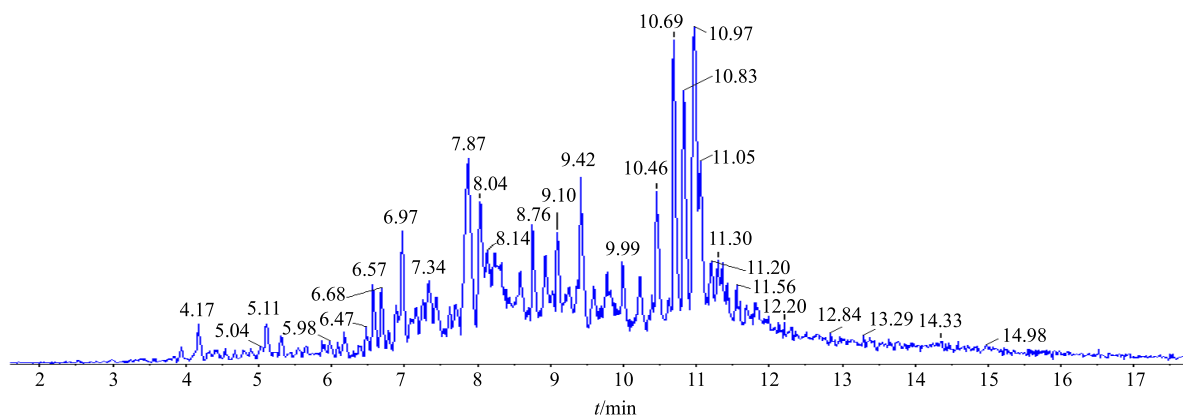


图 1 给药大鼠尿液总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of urine of dosing rats

3.3 PCA

PCA 是一种无监督的多元变量统计分析方法, 可以从多维空间反映各组样本之间的代谢差异和组间样本差异, 是原始数据最初呈现的一种基本原始状态。本实验取假手术组与模型组大鼠给药 8 周后的 24 h 尿液样本进行 PCA 分析, 结果见图 2。在 PCA 得分图上假手术组与模型组的样本点分散于不同的区域, 2 组大鼠代谢图谱具有明显差异趋势, 说明本实验中的手术造模方法是可行的。假手术组的样本点主要分布在第 2、3 象限且比较集中, 具有一定的聚类性, 说明组内大鼠内源性代谢物差异性较小, 代谢状态和变化趋势相对稳定; 模型组样本点主要分布在第 1、4 象限且比较分散, 与假手术组大鼠样本点无明显的交叉和重叠, 说明正常大鼠手术造模后, 尿液中内源性代谢物发生了显著变化。

3.4 PLS-DA

PLS-DA 是一种有监督的多元变量统计分析方法, 该方法与 PCA 相比, 主要是在分析的过程中引入了一个新的变量 (Y 变量), 此变量具有分类信息,

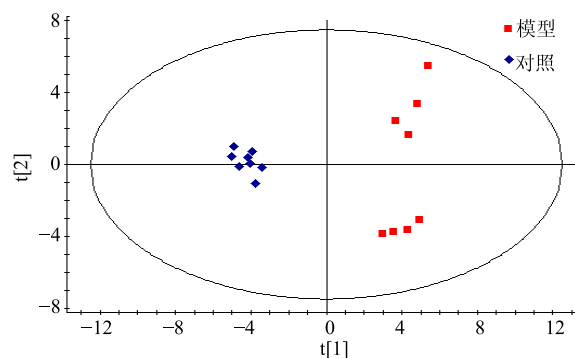


图 2 假手术组与模型组的 PCA 平面得分图

Fig. 2 PCA plane scoring chart of Sham group and model group

从而减少或删除组内差异对分类造成的干扰, 其判别能力优于 PCA。本实验使用 SIMCIA-P 12.0 软件对假手术组大鼠和模型组大鼠给药 8 周后的 24 h 尿液样本采用 PLS-DA 法从整体上进行了代谢谱数据的模式识别, 同时运用响应置换检验验证模型。

PLS-DA 得分图和 200 次模型响应置换结果如图 3 所示。图 3 假手术组与模型组的 PLS-DA 模型相关参数为 $R^2_Y = 0.809$, $Q^2 = 0.696$, 得分图中的

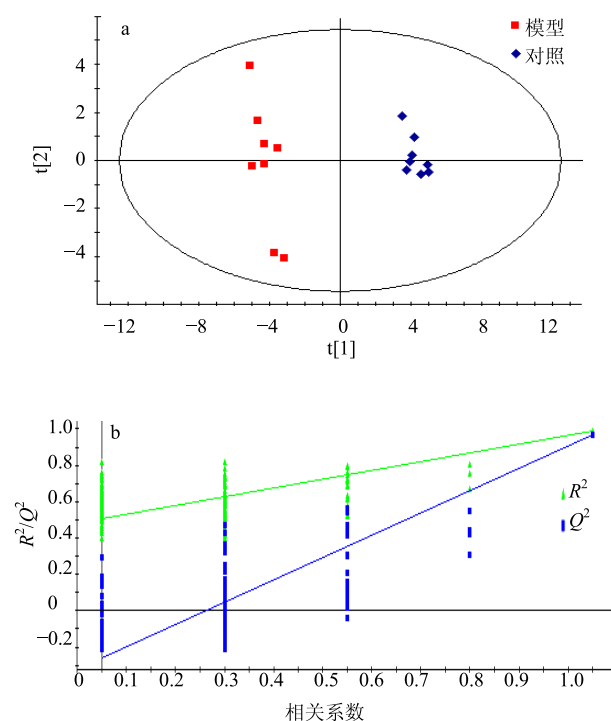


图3 假手术组与模型组的PLS-DA平面得分图(a)及模型响应结果置换图(b)

Fig. 3 PLS-DA plane scoring chart of Sham group and model group (a) and permutation test (b)

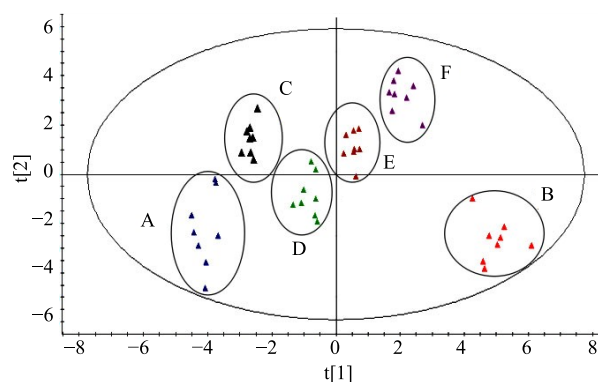
R^2 值代表模型的解释能力, Q^2 值代表模型的预测能力, $Q^2 > 0.5$ 说明模型预测能力较好, 模型有效; $Q^2 > 0.9$ 说明此模型效果突出。模型响应置换结果为 $R^2 = 0.507$, $Q^2 = -0.218$, 响应置换检验中的 $Q^2 < 0$ 则说明建模成功, 没有出现过度拟合。本实验得分图中各组内的样本点也趋于集中, 假手术组与模型组之间分隔更远, 且通过了响应置换检验, 说明该模型的拟合度较好, 进一步验证了 PLS-DA 模型的构建是成功的。

3.5 OPLS-DA

OPLS-DA 是 PLS-DA 的一种衍生运算分析方法, 主要结合了正交矫正信号 (OSC) 和 PLS 2 种方法, 通过将 X 轴矩阵信息分解成与 Y 相关和不相关的 2 类信息, 能够排除与分组不相关的一些变量, 更准确地筛选出有价值的差异性变量, 从而使判别能力更优。通过 OPLS-DA 分析过滤掉不相关的正交信号, 结合差异性变量的重要性投影值 (VIP), 从而使获得的差异性代谢物更加可靠。

本实验对假手术组, 模型组, 贝那普利组, 石榴皮鞣质高、中、低剂量组大鼠给药 8 周后的 24 h 尿液样本进行了 OPLS-DA 分析, 模型相关参数显

示为 $R^2_Y = 0.867$, $Q^2 = 0.754$, 均大于 0.5, 说明此模型构建成功, 具有很好地拟合度和预测能力。从 OPLS-DA 得分图 (图 4) 中可以看出模型组、假手术组、贝那普利组, 石榴皮鞣质给药组呈现出明显的区分。其中, 贝那普利组最为接近假手术组, 这说明贝那普利使得病理大鼠的代谢恢复最接近于正常水平; 石榴皮鞣质高剂量组和中剂量组都不同程度地偏离模型组, 而趋向假手术组, 高剂量组相较于中、低剂量组更为趋近贝那普利组和假手术组, 说明石榴皮鞣质也对病理大鼠的代谢产生了一定的影响, 并使之趋向正常代谢。



A-假手术 B-模型 C-贝那普利 D-石榴皮鞣质 60 mg·kg⁻¹
E-石榴皮鞣质 40 mg·kg⁻¹ F-石榴皮鞣质 20 mg·kg⁻¹
A-Sham B-model C-benazepril hydrochloride D-60 mg·kg⁻¹
of pomerganate tannins E-40 mg·kg⁻¹ of pomerganate tannins
F-20 mg·kg⁻¹ of pomerganate tannins

图4 对照、模型、贝那普利和石榴皮鞣质给药组 OPLS-DA 平面得分图

Fig. 4 OPLS-DA plane scoring chart of Sham, model, benazepril hydrochloride, and pomerganate tannins groups

3.6 生物标志物的确定

通过上述模型的识别与分析, 确定了本实验中 6 组大鼠尿液中内源性代谢物存在显著的代谢差异, 根据 OPLS-DA 中的 VIP 柱状图显示出各个变量的 VIP 值 (图 5), 进行潜在生物标志物的筛选。OPLS-DA 模型中评价变量的贡献程度一般用 VIP 值表示, VIP 值越大, 说明其贡献作用越大, 由于变量的平均 VIP 值都接近于 1, 故常将 $VIP > 1$ 的变量视为对模型具有重要意义。因此本实验将 VIP 值大于 1 的变量作为生物标志物的候选变量, 最终筛选出 16 个 VIP 值大于 1 的变量, 结合载荷图和 t 检验筛选候选变量, 通过这些变量所代表的化合物的质谱信息, 从 Metlin、HMDB、KEGG、PubChem 等数据库中查找出 10 个潜在的生物标志物, 见表 2。

3.7 潜在生物标志物的生物学意义

采用 SPSS 13.0 软件对各组间潜在生物标志物相对峰面积进行 one-way ANOVA 分析, 结果见图 6。本实验所确定的 10 个可能与肾小球硬化有关的潜在生物标志物中, 色氨酸是机体中的必需氨基酸,

在体内能转变为 5-羟色胺、黄尿酸、犬尿酸等多种生理活性物质, 而机体中的犬尿酸的主要来源则是通过色氨酸的代谢转化; 已有研究表明当肾功能不全时犬尿酸的量会升高, 本实验中模型组大鼠色氨酸量较正常大鼠低 ($P<0.05$), 显示色氨酸代谢途

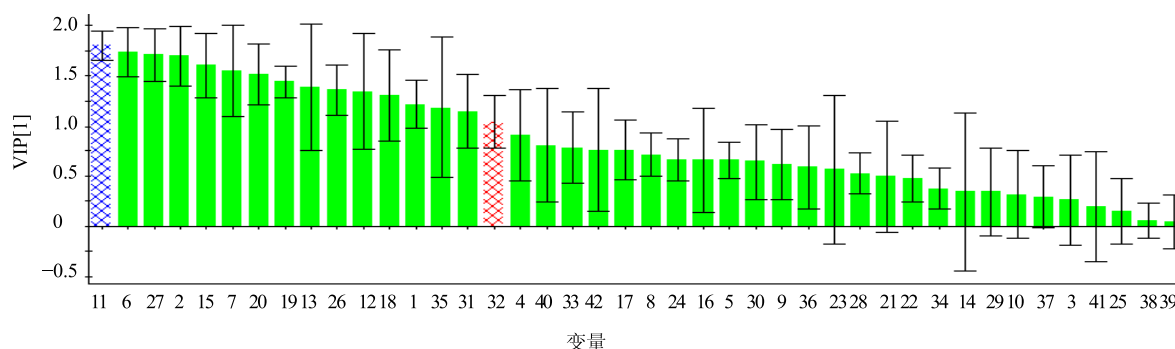


图 5 OPLS-DA 的 VIP 柱状图

Fig. 5 OPLS-DA VIP column chart

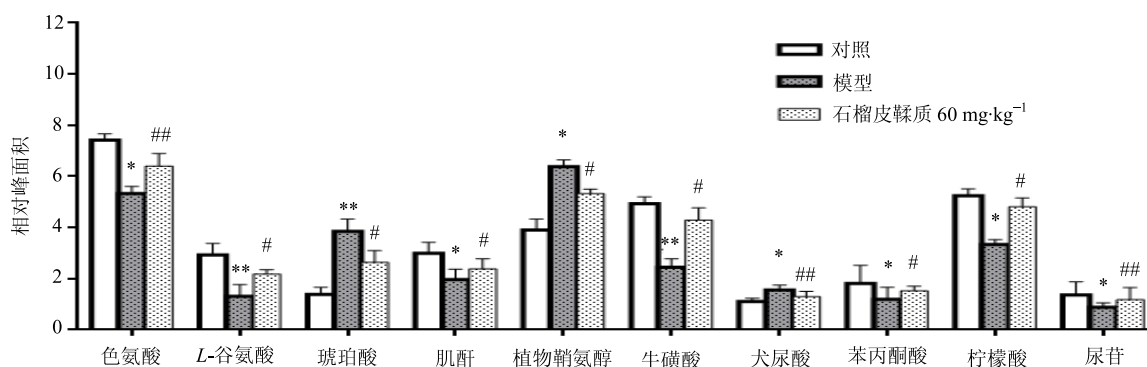
表 2 潜在的生物标志物

Table 2 Potential biomarkers

序号	保留时间	<i>m/z</i>	可能的物质	分子式	变化趋势	
					模型组 vs 假手术组	给药组 vs 模型组
1	1.31	204.22	色氨酸	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	↓ *	↑ ###
2	1.49	147.13	<i>L</i> -谷氨酸	$C_5H_9NO_4$	↓ **	↑ #
3	1.69	118.09	琥珀酸	$C_6H_6O_4$	↑ **	↓ #
4	1.87	113.10	肌酐	$C_4H_7N_3O_2$	↓ *	↑ #
5	3.53	317.50	植物鞘氨醇	$C_{18}H_{39}NO_3$	↑ *	↑ #
6	5.01	125.15	牛磺酸	$C_2H_7NO_3S$	↓ **	↑ #
7	5.43	209.16	犬尿酸	$C_9H_7NO_5$	↑ *	↓ ##
8	10.45	164.15	苯丙酮酸	$C_9H_8O_3$	↓ *	↑ #
9	26.49	192.14	柠檬酸	$C_6H_8O_7$	↓ *	↑ #
10	9.20	244.01	尿苷		↓ *	↑ ##

与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; ↑-上调, ↓-下调

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Sham group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group; ↑ -upregulation, ↓ -downregulation



与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Sham group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group

图 6 各组大鼠尿样中潜在生物标志物相对峰面积

Fig. 6 Relative peak areas of potential biomarkers in urine of rats

径发生变化,而给药组尿液中色氨酸量比模型组稍高 ($P<0.01$),表明色氨酸代谢逐渐回调,同时犬尿酸的生成刚好随之上升,与实验中犬尿酸造模前后变化趋势一致^[9],说明石榴皮鞣质对肾小球尿液晶源性代谢物具有调节作用。

谷氨酸是一种非必需氨基酸,能够与氨结合生成糖代谢与氨基酸代谢的重要中间体谷氨酰胺,与假手术组相比模型组谷氨酸量是显著降低的 ($P<0.01$),说明正常大鼠造模后谷氨酸的代谢发生了紊乱。柠檬酸和琥珀酸都是三羧酸循环过程中的主要中间参与物^[10]。三羧酸循环是能量代谢的重要组成部分,糖、蛋白质、脂肪酸等大分子物质的生物氧化均与之相关,模型组大鼠尿液柠檬酸和琥珀酸的代谢变化趋势均与假手术组大鼠相反,而给予石榴皮鞣质后其量变化都趋近正常,说明石榴皮鞣质能够改善肾小球硬化大鼠的能量代谢。

肌酐是衡量肾脏功能的生化指标之一,大鼠尿液中的肌酐是其体内肌酸的主要代谢产物,肌酐通过血浆转移到肾脏,主要由肾小球滤过排出体外,当肾小球发生病变时,其滤过功能就会降低,此时肌酐的排泄速率小于生成速率,机体内则会蓄积大量肌酐,因此尿肌酐减少或尿肌酐排泄量减少说明肾脏功能不全^[11]。本实验中肾小球硬化大鼠较假手术组肌酐量是下降的 ($P<0.05$),但给予石榴皮鞣质后其肌酐排泄量增加 ($P<0.05$),肌酐代谢逐渐恢复正常,说明大鼠在 ig 给药后肾小球硬化症状有所改善。

植物鞘氨醇是重要的神经鞘氨脂类物质,为细胞细胞膜组成成分之一,细胞代谢、分化、凋亡均与之有关。模型组较假手术组植物鞘氨醇尿液代谢增加,在石榴皮鞣质干预后其代谢逐渐回到正常水平,说明肾小球硬化可能与之有关^[12]。牛磺酸是一种含巯基的非蛋白氨基酸,具有抑制肾脏局部脂质过氧化的作用,对肾小球硬化后期诱导的肾小管损伤具有保护作用,而模型组大鼠尿液中牛磺酸的量是下降的,说明牛磺酸的下降在肾小球硬化病变中起到重要作用^[13]。

苯并酮酸是芳香族蛋白氨基酸苯丙氨酸的生物转化物,转化为苯丙酮酸的原料是苯丙氨酸,而苯丙氨酸又是酪氨酸的合成原料,酪氨酸主要参与多巴胺、肾上腺素等多巴胺类物质的合成,进而对大鼠血液流变学产生一定影响。肾小球硬化模型组大鼠尿液中苯并酮酸排泄减少,说明其合成原料苯丙氨酸减少,推测机体对苯丙氨酸的利用增加,使得代谢途径中转化为儿茶酚胺类物质的量增加,给予石榴皮鞣质后又得以回调,进而以改善肾小球硬化^[14]。

尿苷是核苷酸的一种,主要参与动物细胞核酸的构成,其量变化可以反映机体细胞损伤情况,本实验结果显示肾小球硬化大鼠尿液中尿苷代谢量较假手术组大鼠减少 ($P<0.05$),说明造模后大鼠肾脏受到损伤,其机体对尿苷的利用需求增加^[15]。

3.8 潜在生物标志物的代谢通路分析

将涉及的潜在生物标志物代入 MetPA 数据库中进行分析,构建代谢通路,表 3 和图 7 可知大鼠

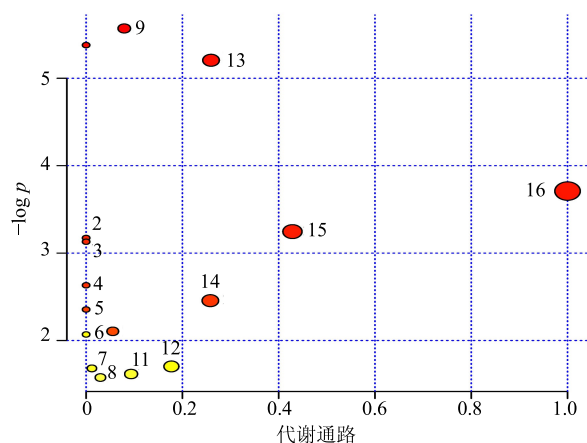
表 3 通过 MetPA 得到的独特的通路分析结果

Table 3 Results of unique path analysis by MetPA

代谢通路	Total Cmpd	Hits	Raw P	FDR	Impact	Details
D-谷氨酰胺代谢	20	2	0.003 811 5	0.149 91	0.079 22	KEGG
胆甾醇丁酸酯代谢	22	2	0.004 612 1	0.149 91	0	KEGG
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	24	2	0.005 484 5	0.149 91	0.259 49	KEGG
三羧酸循环	5	1	0.024 491 0	0.502 08	1	KEGG
牛磺酸和亚牛磺酸代谢	8	1	0.038 938 0	0.512 06	0.428 57	KEGG
氨酰生物合成	69	2	0.041 879 0	0.512 06	0	KEGG
氮代谢	9	1	0.043 713 0	0.512 06	0	KEGG
组氨酸代谢	15	1	0.071 936 0	0.737 34	0	KEGG
二元羧酸代谢	18	1	0.085 777 0	0.778 23	0.258 06	KEGG
丙酸代谢	20	1	0.094 906 0	0.778 23	0	KEGG
谷胱甘肽代谢	26	1	0.121 830 0	0.862 68	0.055 34	KEGG
卟啉和叶绿素代谢	27	1	0.126 250 0	0.862 68	0	KEGG
色氨酸代谢	40	1	0.181 990 0	1.000 00	0.177 15	KEGG
嘧啶代谢	41	1	0.186 140 0	1.000 00	0.012 02	KEGG
精氨酸和脯氨酸代谢	44	1	0.198 510 0	1.000 00	0.093 47	KEGG
胆汁酸合成	46	1	0.206 670 0	1.000 00	0.029 76	KEGG

Total Cmpd: 通路中化合物的总数; Hits: 上传的标志物数据与代谢组库精确匹配的个数; Raw P: 通过通路分析得出的原始 P 值; Impact: 通过拓扑分析得出的通路影响值; FDR: 控制 P 值真实性的数值; Details: 代谢通路数据库来源

Total Cmpd: total number of compounds in pathway; Hits: number of markers that uploaded data matched by repository Raw P: original P values obtained by path analysis; Impact: impact of path by topology analysis; FDR: false discovery rate; Details: the source of the metabolic pathway database



1-胆甾醇丁酸酯代谢 2-氨酰生物合成 3-氮代谢 4-组氨酸代谢
5-丙酸代谢 6-卟啉和叶绿素代谢 7-嘧啶代谢 8-胆汁酸合成
9-D-谷氨酰胺代谢 10-谷胱甘肽代谢 11-精氨酸和脯氨酸代谢
12-色氨酸代谢 13-丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 14-二元羧酸代谢 15-牛磺酸和亚牛磺酸代谢 16-三羧酸循环
1-butanoate metabolism 2-aminoacyl-tRNA biosynthesis 3-nitrogen metabolism 4-histidine metabolism 5-propanoate metabolism
6-porphyrin and chlorophyll metabolism 7-pyrimidine metabolism 8-primary bile acid biosynthesis 9-D-glutamine metabolism 10-glutathione metabolism 11-arginine and proline metabolism 12-tryptophan metabolism 13-alanine, aspartate and glutamate metabolism 14-glyoxylate and dicarboxylate metabolism 15-aurine and hypotaurine metabolism 16-TCA cycle

图 7 使用 MetPA 数据库构建相关代谢通路图

Fig. 7 Related metabolic pathways built by MetPA database

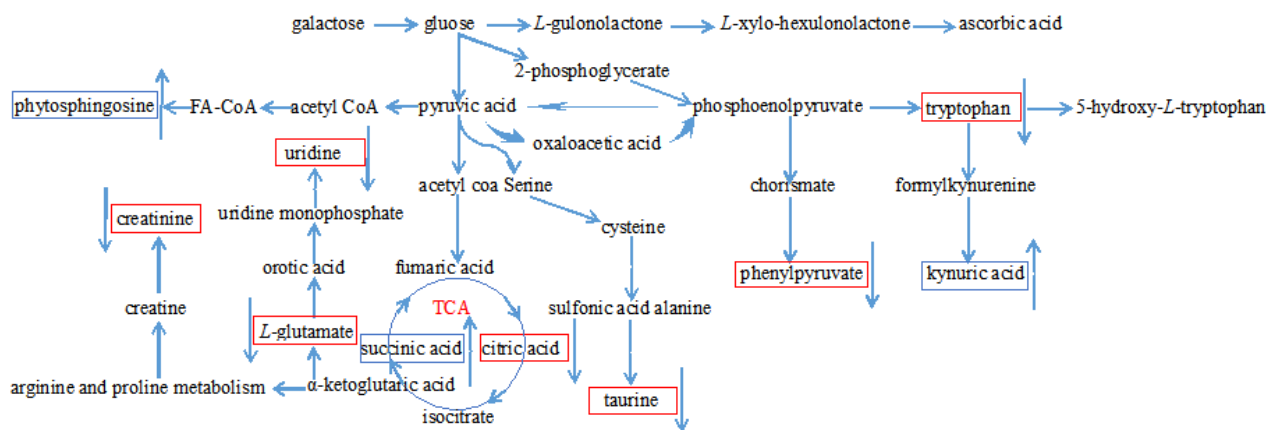


图 8 差异性代谢物在相关代谢通路的代谢网络图

Fig. 8 Metabolic networks of different metabolites in relevant metabolic pathways

短，提高动物造模存活率，本研究采用了肾单侧切除结合 2 次尾 iv 注射多柔比星的方法构建此模型；一方面单侧肾脏切除较肾大部切除具有方法简单、针对性强、大大提高动物术后存活率的特点；另一方面再结合在单侧肾切除的基础上分次注射多柔比星，借助单侧残肾造成的高跨膜高压状态使得原来

肾小球硬化涉及的代谢通路包括三羧酸循环、胆汁酸合成、二元羧酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、色氨酸等多种氨基酸代谢等共 16 条。代谢通路影响值的临界值设置为 0.1，高于这个值将被选择作为潜在的靶标路径。从图 7 中可以看出色氨酸代谢，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，二元羧酸代谢，牛磺酸和亚牛磺酸代谢，D-谷氨酰胺代谢 5 条代谢途径在石榴皮鞣质改善肾小球硬化大鼠大鼠内源性代谢中起到重要作用。

构建代谢通路的优势在于独特的代谢通路分析能够从整体层面反映出生物化学的扰动，以及损伤的潜在机制，为代谢作用机制的分析提供更为全面的信息依据。

图 8 为尿液代谢谱中 10 个差异性代谢物在相关代谢通路的代谢网络，从整个网络图可以看出本实验筛选出的几种代谢物相互之间都有不同程度的扰动，因此对肾小球硬化有明显的影

4 讨论

本实验前期研究工作采用的是单纯多次 iv 盐酸多柔比星的方法造肾小球硬化模型，发现其造模周期较长，大鼠肾损伤严重。而肾大部切除手术法也是肾小球硬化的常用造模方法，虽造模周期较短但造模后动物存活率也不高。为了实现造模周期

分布于 2 侧的多柔比星集中于 1 侧，减少多柔比星用量，降低肾多度损伤等副作用，极大缩短造模周期。实验中对大鼠进行观察发现其临床表现更为稳定，大鼠存活率较高，模型制作时间明显缩短。

本实验通过 HPLC-MS 技术对肾小球硬化大鼠尿液进行代谢组学分析，通过 PCA、PLS-DA、OPLS-DA

等分析模式共发现了 10 种与肾小球硬化相关的潜在生物标志物。通过相关数据和 MetPA 分析得到 6 条最可能的代谢相关通路, 分别是精氨酸和脯氨酸的代谢、色氨酸代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、二元羧酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、D-谷氨酰胺代谢, 说明这几种内源性物质与肾小球硬化发病机制联系较为紧密。这些内源性代谢产物在大鼠体内量的变化从一定程度上反映了肾单侧切除结合 iv 盐酸多柔比星构建的肾小球硬化大鼠体内代谢水平的变化, 为监测疾病生理状态下体内代谢物的变化和肾小球硬化的预防和改善提供了一定依据。本实验中肾小球硬化大鼠在石榴皮鞣质干预下其体内内源性代谢物聚类性趋近正常水平, 对肾小球硬化大鼠代谢紊乱有一定的恢复作用。运用代谢组学的方法探讨石榴皮鞣质对肾小球硬化大鼠内源性物质代谢的影响, 从机体整体代谢水平研究中药多种成分对疾病的治疗作用, 为石榴皮鞣质对肾小球硬化模型大鼠作用机制的深入研究奠定了一定基础。

参考文献

- [1] Beneden K V, Geers C, Pauwels M, *et al.* Comparison of trichostatin A and alproic acid treatment regimens in a mouse model of kidney fibrosis [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2013, 271(2): 276-284.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 周本宏, 周 静, 梁艺小, 等. 石榴皮鞣质对肾纤维化大鼠内源性代谢物的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(23): 2009-2013.
- [4] 涂 杰, 刘苗苗, 吴 玥, 等. 石榴皮鞣质对慢性肾小球肾炎大鼠内源性代谢物的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(8): 673-678.
- [5] 周本宏, 周 静, 郭咸希, 等. 石榴皮鞣质改善大鼠被动型 Heymann 肾炎作用研究 [J]. *中国药师*, 2015, 18(10): 1629-1633.
- [6] Keun H C, Athersuch T J. Application of metabonomics in drug development [J]. *Pharmacog J*, 2016, 8(7): 731-741.
- [7] 周本宏, 金 龙, 张琛霞, 等. 大孔吸附树脂富集纯化石榴皮总鞣质的工艺条件优选 [J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(23): 1859-1863.
- [8] Wan Y G, Che X Y, Sun W, *et al.* Low-dose of multi-glycoside of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. a natural regulator of TGF- β 1/Smad signaling activity improves adriamycin-induced glomerulosclerosis *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(3): 1079-1089.
- [9] 周本宏, 周 静, 郭咸希, 等. 石榴皮鞣质改善大鼠被动型 Heymann 肾炎作用研究 [J]. *中国药师*, 2015, 18(10): 1629-1633.
- [10] 周本宏, 周 静, 梁艺小, 等. 石榴皮鞣质改善大鼠肾纤维化作用研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(11): 1585-1590.
- [11] 高家荣, 庄星星, 魏良兵, 等. 基于 UPLC/QTOF-MS 技术的丹蛭降糖胶囊在 2 型糖尿病大鼠体内尿液代谢组学研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(14): 2096-2103.
- [12] Wang Y F, Man H X, Gao J, *et al.* Plasma metabonomics study on toxicity biomarker in rats treated with *Euphorbia fischeriana* based on LC-MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(9): 1386-1396.
- [13] Fang J, Wang W, Sun S, *et al.* Urinary metabonomics study on 5/6 nephrectomy-induced chronic renal failure in rats and intervention effects of total aglycone extracts of *Scutellaria baicalensis* [J]. *Rsc Advances*, 2015, 92(5): 60-74.
- [14] Li Y, Sheng N, Wang L, *et al.* Analysis of 2-(2-phenylethyl) chromones by UPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate statistical methods in wild and cultivated *Agarwood* [J]. *Inter J Mol Scis*, 2016, 17(5): 771-791.
- [15] Antonowicz S, Kumar S, Wiggins T, *et al.* Diagnostic metabolomic blood tests for endoluminal gastrointestinal cancer-a systematic review and assessment of quality [J]. *Cancer Epidem Biomar*, 2016, 25(1): 6-16.